

美洲大蠊主要变应原蛋白的质谱鉴定与分析

胡 川^{1,2}, 刘志刚^{1*}, 李金生², 韩庆国¹, 林立丰³, 阴伟雄³

(1. 深圳大学生命科学学院微生物基因工程重点实验室 广东深圳 518060;
2. 江西医学院基础医学部 南昌 330006; 3. 广东省疾病预防控制中心昆虫研究所 广州 510300)

摘要:为了建立美洲大蠊 *Periplaneta americana* 变应原蛋白的质谱鉴定方法 我们将美洲大蠊粗浸液通过 DEAE-52 离子交换层析、Sephadex S-200 凝胶过滤层析等分离步骤得到纯化的 74 kD 蛋白 对纯化前后的该 74 kD 蛋白分别进行 SDS-PAGE 及凝胶内胰酶酶切, 再经液相色谱-电喷雾-串联质谱(HPLC-ESI-MS/MS)在线联机分析 所得质谱数据进入网站(<http://www.matrixscience.com>)进行 Mascot 检索比对。通过对两者质谱鉴定结果的比较来评估美洲大蠊天然主要变应原蛋白的纯化效果。结果表明, 纯化蛋白经 HPLC-ESI-MS/MS 鉴定是美洲大蠊主要变应原蛋白 离子交换层析等纯化步骤可以去除同一分子量的杂蛋白(如卵黄原蛋白), 从而获得较好的鉴定结果。我们首次成功地运用质谱建立起变应原蛋白的新鉴定方法。

关键词:美洲大蠊 ; 液相色谱 ; 电喷雾 ; 串联质谱 ; 变应原 ; 鉴定

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2005)02-0305-05

Identification of the major allergen in *Periplaneta americana* by HPLC-ESI-MS/MS

HU Chuan^{1,2}, LIU Zhi-Gang^{1*}, LI Jin-Sheng², HAN Qing-Guo¹, LIN Li-Feng³, YIN Wei-Xiong³ (1. Shenzhen Key Laboratory of Genetic Engineering, College of Life Sciences, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China; 2. Department of Biochemistry, Jiangxi Medicinal College, Nanchang 330006, China; 3. Institute of Entomology, Guangdong Provincial Centre for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510300, China)

Abstract: A new method to identify allergen of *Periplaneta americana* with HPLC-ESI-MS/MS was established. The protein with molecular weight of 74 kD from *P. americana* was purified by sequential chromatography of two steps including ion exchange chromatography and gel filtration chromatography. After in-gel digestion of allergen, the tryptic peptide mapping of allergen was obtained by HPLC-ESI-MS/MS. The data were then searched against NCBI database using MS/MS Ions search (<http://www.matrixscience.com>). We compared the results of identification of 74 kD protein from the crude extract of *P. americana* and from the purified protein to evaluate the effect of purification. Our data showed that the purified protein with molecular weight of 74 kD is the major allergen of *P. americana*. The steps of chromatography are effective to remove the other protein with the same size as the purified protein. To our knowledge, this is the first report on the identification of the major allergen from *P. americana* by HPLC-ESI-MS/MS. The research indicated that the MS is simple and universal for the quality control of naturally purified allergen.

Key words: *Periplaneta americana*; liquid chromatography; electrospray ionization trap; tandem mass spectrometry; allergen; identification

质谱已经成为一项在蛋白质组学领域中有推动意义的技术, 尤其在蛋白质的鉴定方面起着重要的作用(Roepstorff, 1997)。变应原蛋白的研究是变态反应的基础, 是提高变态反应性疾病防治水平的原动力。Bernton 和 Brown(1964)首次报道蟑螂变应原蛋白是引起Ⅰ型变态反应的一种重要的昆虫变应

原。目前国内临幊上所使用的蟑螂浸液均为粗浸液, 含有多种杂蛋白(如蛋白酶)(Kordash *et al.*, 1993; Wongtim *et al.*, 1993)。我国南方的蟑螂种类主要是美洲大蠊 *Periplaneta americana*, 占 70%, 为优势种群(叶世泰, 1987)。为了尽可能使用具有我国区域特色(即本地化)并经过标准化的蟑螂变应原以

基金项目: 国家自然科学基金项目(39860071); 广州市科技重点项目(2002Z2-E4021)

作者简介: 胡川, 男, 1974 年生, 硕士, 讲师, 从事蛋白纯化研究, E-mail: huchuan1974@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence; E-mail: LZG@szu.edu.cn; Tel.: 0755-26558941

收稿日期 Received: 2004-01-04; 接受日期 Accepted: 2004-09-24

在临床变态反应疾病的诊断和脱敏治疗中提高诊断的特异性和治疗疗效,我们运用离子交换层析与凝胶过滤层析等方法对美洲大蠊主要变应原进行了纯化和免疫学特性鉴定(另文报道),但其变应原蛋白的生物质谱鉴定尚未见报道。本文旨在运用快速灵敏的 HPLC-ESI-MS/MS 技术建立变应原蛋白新的鉴定方法,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

美洲大蠊由广东省疾病预防控制中心昆虫研究所惠赠,经本室纯培养多代后取材进行样品制备。

1.2 主要试剂和设备

电泳装置(Bio-Rad 公司);HPLC-ESI-MS/MS(Agilent 1100 series LC/MSD Trap);乙腈(美国 Tedia 公司);甲酸(色谱纯,天津);ZORBAX300SB(Agilent)胰酶(Promega 公司);三氟乙酸(TFA,美国 Tedia 公司)。

1.3 样品制备

美洲大蠊粗浸液制备参照乔秉善(1996)方法。粗浸液经 DEAE 52 离子交换层析得到目的峰收集液,该液冷冻干燥后经 Hiprep Sephadryl[®] S-200 凝胶过滤层析获得含 74 kD 纯化蛋白的目的收集峰,采用 Western blotting 对该蛋白在各步层析中的变应原活性做免疫学鉴定,其中一抗血清为对蟑螂过敏患者阳性血清(深圳市人民医院变态反应科惠赠),二抗为生物素标记的羊抗人 IgE(ε),链霉亲和素为辣根过氧化物酶所标记,DAB 显色。该 74 kD 蛋白即为质谱鉴定的样品。

1.4 凝胶内酶切

1.4.1 SDS-PAGE 分离: 将美洲大蠊粗浸液以及其经两步层析后所得纯化蛋白样品分别进行 SDS-PAGE(12% 分离胶,5% 浓缩胶),考马斯亮蓝 R-250 染色,脱色,用刀片分别将纯化前后的 74 kD 单一蛋白条带以 1 mm³ 体积切成胶粒,用含 50% 乙腈的 25 mmol/L NH₄HCO₃ 溶液使之脱色完全,微加热使胶粒完全干燥。

1.4.2 酶切前处理: 干燥胶粒中加含 1.5 mg/mL 二硫苏糖醇的 25 mmol/L NH₄HCO₃,56℃水浴 1 h,弃二硫苏糖醇;加含 10 mg/mL 碘乙酰胺的 25 mmol/L NH₄HCO₃,暗室 37℃ 1 h,弃碘乙酰胺,100 mmol/L NH₄HCO₃ 洗涤数次,干燥过夜。

1.4.3 胰蛋白酶酶切: 干燥胶粒加 0.1 μg/μL 胰蛋

白酶 5~10 μL 以及 200 μL 100 mmol/L NH₄HCO₃,待充分湿润并覆盖干燥胶粒后,再补充 200 μL 100 mmol/L NH₄HCO₃,37℃ 酶解 21 h。

1.4.4 混合肽提取: 充分酶解后稍离心收集上清液,沉淀胶粒中再加 200 μL 0.2% 三氟乙酸,40℃ 1 h,稍离心收集上清液,合并上清液,冷冻干燥,再用 150 μL 0.2% 三氟乙酸溶解混匀后进行 HPLC-ESI-MS/MS 鉴定分析。

1.5 HPLC-ESI-MS/MS 条件

高压液相色谱仪(HPLC)通过电喷雾离子源(ESI)接口与质谱仪(MS)在线联接。HPLC 条件:色谱柱为 C₁₈:ZORBAX300SB(5 μm, 2.1 mm × 150 mm),洗脱梯度为 5%~60%,60 min;流动相:A 液为含 0.1% 甲酸的水溶液(水为 HPLC 级),B 液为含 0.1% 甲酸的乙腈溶液,流速 0.3 mL/min;柱温:室温,检测波长为 214 nm;自动进样器进样 20 μL。ESI-MS/MS 检测条件:电喷雾电离源(ESI);正离子模式(positive mode)扫描范围 200~1 800 m/z,分离宽度为 4 m/z;自动串级质谱分析(Auto-MS/MS),干燥气温度 250℃,干燥气流速 10 L/min。

1.6 质谱分析

将质谱所得所有肽段的质量数及其 MS/MS 图谱(碎片离子质量数)同时送入 NCBIInr 数据库,使用 Mascot(网址:<http://www.matrixscience.com/>,Matrix Science Ltd,UK)中的串级质谱数据搜索功能(MS/MS Ions Search)与数据库中相应肽段的理论质量数及其 MS/MS 裂解图谱进行相关性比较检索鉴定。

2 结果

2.1 美洲大蠊 74 kD 蛋白的分离、纯化及活性鉴定

图 1 为美洲大蠊粗浸液经离子交换层析和凝胶过滤层析后 SDS-PAGE 分析及 Western blotting 鉴定结果,凝胶过滤层析目的峰为分子量 74 kD 的单一活性条带,该条带和粗浸液中具有相同分子量的 SDS-PAGE 条带均为经凝胶内酶切的目的条带。

2.2 纯化抗原的质谱分析

待鉴定的蛋白条带经胰蛋白酶酶切后,肽段混合物上 HPLC-ESI-MS/MS,所获得的相关质谱数据经 Mascot 检索,将前 4 个得分最高的匹配结果并排序。未经色谱纯化的美洲大蠊粗浸液中 74 kD 蛋白和经色谱纯化的 74 kD 蛋白的 HPLC-ESI-MS/MS 鉴定结果分别如图 2、图 3 所示。

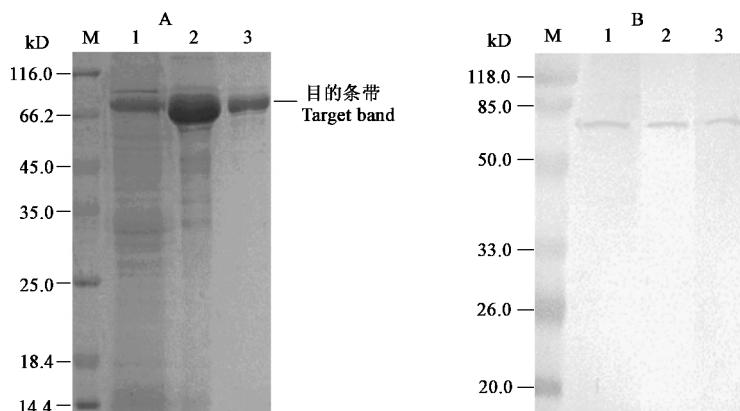


图 1 美洲大蠊粗浸液及其各纯化步骤目的收集峰 SDS-PAGE 分析(A)和 Western blotting 鉴定(B)

Fig. 1 SDS-PAGE(A) and Western blotting(B) of sequential chromatography of two steps including DEAE-cellulose 52 IEC and Hiprep Sephadryl[®] S-200 GFC

M : 分子量标志 Marker ; 1 : 美洲大蠊全虫粗浸液 Crude extract of *Periplaneta americana* ;

2 : DEAE 52 离子交换层析目的收集峰 Target peak of IEC ; 3 : 凝胶过滤层析目的收集峰 Target peak of GFC.

Probability Based Mowse Score

Score is $-10^* \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.

Individual ions scores > 52 indicate identity or extensive homology ($P < 0.05$).

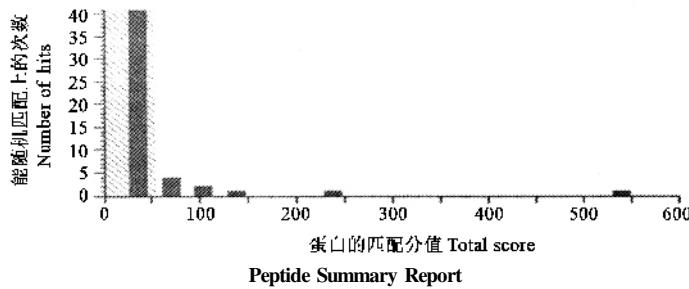


图 2 美洲大蠊粗浸液中 74 kD 蛋白 HPLC-ESI-MS/MS 鉴定结果

Fig. 2 Mascot search results of 74 kD protein from the crude extract of *Periplaneta americana*

未经纯化粗浸液的 74 kD 蛋白经质谱鉴定(图 2)最具可能(匹配分数最高 ,541 分)是美洲大蠊卵黄原蛋白-2(vitellogenin-2),其次才是美洲大蠊变应原蛋白(匹配分数 222 分).

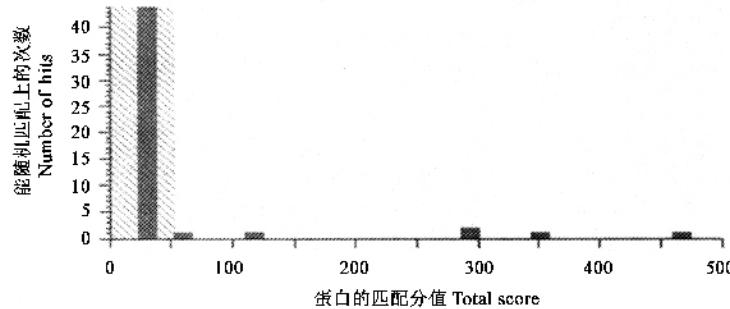
经离子交换和凝胶过滤层析后所得的 74 kD 纯化蛋白经质谱鉴定(图 3)最具可能是美洲大蠊

75.464 kD 变应原蛋白(匹配分数最高 468 分),图 3 还列出了数据库中该蛋白的一些基本信息如等电点 (6.61)及氨基酸序列 ,阴影标记的序列为肽段及碎片离子质量数理论值与实测值相符的肽段序列 ,共计 15 个肽段的串级质谱图得到了匹配 ,质量数相符的肽段的序列覆盖率为 17% 。

Probability Based Mowse Score

Score is $-10^* \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.

Individual ions scores > 52 indicate identity or extensive homology ($P < 0.05$).

**Peptide Summary Report**

| Accession | Mass | Total score | Peptides matched | Description |
|---------------|--------|-------------|------------------|--|
| gi : 11531589 | 75 464 | 468 | 15 | allergen [<i>Periplaneta americana</i>] |
| gi : 11580797 | 46 717 | 365 | 14 | allergen [<i>Periplaneta americana</i>] |
| gi : 11580794 | 56 153 | 300 | 11 | allergen [<i>Periplaneta americana</i>] |
| gi : 12833325 | 81 123 | 284 | 11 | allergen Cr-PI precursor(allergen Per a 3) |

Match to : gi11531589 ; Score : 468

allergen [*Periplaneta americana*]

Nominal mass (Mr) : 75 464 ; Calculated pI value : 6.61

Cleavage by Trypsin : cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage : 17%

| | | | | | |
|-----|--------------|--------------|---------------|-------------|--------------|
| 1 | DIGDHYDIEA | NIGHYKYPHV | VKNFISYYKK | GLLPRGEFPS | VYYEKHREQA |
| 51 | IKLFELFFAA | NDYDTFYKTA | CWARDRVNEG | MFMYALTVAAC | FHREDTKDLV |
| 101 | LPPPYEVNPY | LFVEDDVHQQQ | AYK YWTIK ESG | TDKHVEHVIP | VNFATAR SQED |
| 151 | LVAYFV EDVD | LNAFNMYFRY | IYPSWFNTTL | YGKSFDRRGE | QFYTYHQIY |
| 201 | AR YFLER LSN | SLPDVKPFQY | SKPLKTGYNP | HLRYHNGEEM | PARPSNMYPY |
| 251 | NFDLFYVSDI | KNYERRVEKA | IDFGYAFDEH | R TPYSLYHDQ | HGMMDYLGQMI |
| 301 | EGTRNSPHQY | FYGSVFHFYR | LLVGHVVDPY | HKNGLAPSAL | EHPQTALR DP |
| 351 | AFYQLWK R ID | HIVQK YKNRL | PR YTYDELFSF | PGVKIENVDV | GK LYTYFEHF |
| 401 | EHSLGNAMYL | GKLEDYMKAS | IRARHYR LNH | KPFTYNIEVS | SDKAQDVTYVR |
| 451 | IFLGPK YDSL | GHECELDERR | HYFVEMDRFV | HKVEAGKTVI | ERKSHDSSII |
| 501 | SDSHDSYRNLL | FKK VSDLALQE | KDQYYIDK SH | KYCGYPENLL | LPKGKKGGQT |
| 551 | FTFYVIVTPY | VKQDEHDPEP | YHYKAFSYCG | VGHGRKYPDD | KPLGFPFDRK |
| 601 | IHDYDFYTPN | MYFKDVVIFH | KKYDEVHDVT | H | |

图 3 美洲大蠊 74 kD 纯化蛋白 HPLC-ESI-MS/MS 鉴定结果

Fig. 3 Mascot search results of 74 kD purified protein of *Periplaneta americana*

3 讨论

Wu 和 Lan(1988) Wu 等(1996)报道了美洲大蠊粗浸液有 9 种变应原成分 ,通过 Western blotting 鉴定其中 72 kD 和 78 kD 蛋白可以结合 100% 的美洲大蠊致敏患者血清特异性 IgE ,为美洲大蠊主要变应原 Per a 3 (Cr-PI 组分)。高波等(2005)用基因工程技术使美洲大蠊变应原 Cr-PI 在大肠杆菌中得到高效表达 ,并证实该重组变应原具有良好的 IgE 结合活性。

尽管 Per a 3 蛋白与其他已知的变应原无任何序列相似性 ,具高度种属特异性 ,但它与昆虫存贮蛋白、昆虫幼虫激素抑制蛋白及节肢动物的血蓝蛋白分别有 20.1% ~ 36.5% 不等的序列同源性 ,这说明美洲大蠊的主要变应原可能与昆虫的血淋巴蛋白有关 因而代表着血蓝蛋白超家族一类新的蛋白质 (Wu et al . ,1997)。而昆虫卵内的卵黄物质是成虫期在脂肪体合成后释放到血淋巴中 ,最后被发育的卵母细胞选择性地摄取积累 ,卵黄物质在被卵母细胞摄取前称为卵黄原蛋白(vitellogenin)。卵黄原蛋

白进入血淋巴是否与 Per a 3 结合及以何种形式结合尚不能确定。我们的结果证实,尽管在 SDS-PAGE 上分子量均为 74 kD,但未经纯化的粗浸液中 74 kD 蛋白经质谱鉴定最具可能是美洲大蠊卵黄原蛋白-2,其次才可能是美洲大蠊变应原蛋白,而经纯化后所得的 74 kD 蛋白经质谱鉴定最具可能是美洲大蠊 75.464 kD 变应原蛋白,这提示卵黄原蛋白的降解片段与 Per a 3 变应原蛋白在 SDS-PAGE 上呈近似分子量(74 kD)共分离,因此美洲大蠊粗浸液中未经纯化的 74 kD 蛋白经凝胶内酶切质谱鉴定结果有卵黄原蛋白的成分,但经过色谱纯化尤其是离子交换层析之后,由于带电荷性质不同从而导致两者被完全分离,故 74 kD 纯化蛋白的凝胶内酶切质谱鉴定结果匹配分数最高的前 4 项均为美洲大蠊变应原成分而完全排除了卵黄原蛋白的成分,因此我们认为纯化步骤对质谱鉴定结果会产生重要影响,在对目的蛋白凝胶内酶切进行质谱鉴定之前有必要进行一定的色谱(如离子交换层析等)以去除杂蛋白的干扰。

事实上,在蛋白质组学研究中,将高灵敏度质谱与高分辨度二维凝胶电泳二大关键技术的结合(即对 2D-PAGE 上斑点进行质谱鉴定)已是当前蛋白质组学研究中必不可少的技术平台。以电喷雾电离和基质辅助激光吸电离为代表的软电离技术开拓了质谱一个崭新领域——生物质谱,并很快渗透到蛋白质研究领域(Fenn et al., 1989)。电喷雾所产生的多电荷离子易碎裂使碰撞活化灵敏度提高,特别适合于串联质谱分析;而 MS 与已有的生物大分子研究方法如液相色谱等互补从而使联机 HPLC-ESI-MS/MS 具有准确、灵敏、快速的特点,适用于蛋白质和多肽的肽质量指纹谱和一级结构分析(钱小红和贺福初,2003)。

国外有学者(Sander et al., 1998)通过液相色谱-电喷雾-质谱建立肽质量指纹谱而鉴定了曲霉菌中各种变应原蛋白的酶性质,其中最主要的变应原被鉴定为 β -木糖苷酶(Asp n 14)。美洲大蠊主要变应原的质谱鉴定国内外尚未见报道。本文首次报道了 HPLC-ESI-MS/MS 在线联用技术在美洲大蠊天然变应原蛋白分析鉴定中的应用,提高了其鉴定结果的可靠性,在变态反应学技术领域对纯化的变应原蛋

白质量控制和标准化具有重要意义。

参考文献(References)

- Bernton HS, Brown H, 1964. Insect allergy-preliminary studies of the cockroach. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 35: 506-513.
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM, 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246(4 926): 64-71.
- Gao B, Liu ZG, Xing M, Xu H, Luo SW, Lai R, 2005. Expression, purification and characterization of the American cockroach Cr PI allergen. *Acta Entomologica Sinica*, 48(1): 13-17. [高波,刘志刚,邢苗,徐宏,罗时文,赖仞,2005. 美洲大蠊变应原 Cr PI 的表达、纯化与免疫学特性鉴定. 昆虫学报, 48(1): 13-17]
- Kordash TR, Amend MJ, Williamson SL, Jones JK, Plunkett GA, 1993. Effect of mixing allergenic extracts containing *Helminthosporium D. farinace*, and cockroach with perennial ryegrass. *Ann. Allergy*, 71(3): 240-246.
- Qian XH, He FC, 2003. Proteomics: Theory and Method. Beijing: Science Press. [钱小红,贺福初,2003. 蛋白质组学 理论与方法. 北京科学出版社]
- Qiao BS, 1996. Experimental Technology of Allergy. Beijing: Peking Union Medical College Press. [乔秉善,1996. 变态反应学实验技术. 北京:中国协和医科大学出版社]
- Roepstorff P, 1997. Mass spectrometry in protein studies from genome to function. *Current Opinion in Biotech.*, 8: 6-13.
- Sander I, Rauf-Heimsoth M, Siethoff C, Lohaus C, Meyer HE, Baur X, 1998. Allergy to *Aspergillus*-derived enzymes in the baking industry: identification of beta-xylosidase from *Aspergillus niger* as a new allergen (Asp n 14). *J. Allergy Clin. Immunol.*, 102(2): 256-264.
- Wongtim S, Lehrer SB, Salvaggio JE, Horner WE, 1993. Protease activity in cockroach and basidiomycete allergen extracts. *Allergy Proc.*, 14(4): 263-268.
- Wu CH, Lan JL, 1988. Cockroach hypersensitivity: isolation and partial characterization of major allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 82: 727-735.
- Wu CH, Lee MF, Liao SC, Luo SF, 1996. Sequencing analysis of cDNA clones encoding the American cockroach Cr-PI allergens. Homology with insect hemolymph proteins. *J. Biol. Chem.*, 271(30): 17 937-17 943.
- Wu CH, Lee MF, Wang NM, Luo SF, 1997. Sequencing and immunochemical characterization of the American cockroach Per a 3(Cr-PI) isoallergenic variants. *Mol. Immunol.*, 34(1): 1-8.
- Ye ST, 1987. Practical Allergy. Beijing: People's Medical Publishing House. [叶世泰,1987. 实用变态反应学. 北京:人民卫生出版社]

(责任编辑:黄玲巧)